

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 17 DEC 2001

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts TM5100 LG/vm	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08662	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 10/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/56		
Anmelder TAD PHARMA GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  12/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  14.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Espen, J  Tel. Nr. +31 70 340 2625



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-13                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-23                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/7-7/7                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-3, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der  
erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und  
Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1). Die vorliegende Anmeldung hat als Gegenstand die regulatorische Sequenz, im besonderen die Promotersequenz, des für die Endopolygalakturonase (EPG) kodierenden Gens (SEQ ID Nr. 1).

2.1). Die vorliegende Anmeldung erfüllt die Erfordernisse von Art. 33 (2) PCT, da die zur Verfügung stehende Stand der Technik nicht neuheitsschädlich ist für den Gegenstand der Ansprüche 1-23.

2.2). Dokument D1 (SIEKSTELE RIMANTAS ET AL: 'Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1).', YEAST, 15-03-1999, Seiten 311-322) wird als nächstliegender Stand gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart die für die Endopolygalakturonase (EPG) kodierende Sequenz (D1, Abb. 1).

Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich von D1 dadurch, daß SEQ ID NO 1 sich auf die -1146 bis -1 Sequenz bezieht, welche sich 5' vom Translationsstart der für die Kluyveromyces (K.) marxianus Endopolygalakturonase kodierenden Sequenz befindet. Die Sequenz aus SEQ ID NO 1 und die in D1 beschriebene Sequenz überlappen in einem Bereich von 572 nt.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß weitere regulatorische Sequenzen aus Hefe dem Stand der Technik zur Verfügung gestellt werden.

Der Gegenstand von Anspruch 1 wird als erfinderisch angesehen, da die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO 1 nicht in naheliegender Weise aus D1 ableitbar war.

Daher erfüllen Ansprüche 1-23 die Erfordernisse von Art. 33 (3) PCT.

Die industrielle Anwendbarkeit des Gegenstandes der Ansprüche 1-23 wird anerkannt (Art. 33 (4) PCT).

**Zu Punkt VIII**

**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Die Ansprüche 4-7, und 17-20 erfüllen nicht die Erfordernisse von Regel 13bis.3 (a) PCT, weil in der Bezugnahme auf die hinterlegten Plasmide/Mikroorganismen (Beschreibung, Seite 5) das Datum der Hinterlegung fehlt.

Weiterhin ist es unmöglich, daß die gleiche Hinterlegungsnummer sich gleichzeitig auf ein Plasmid (Ansprüche 4-7) und ein E. coli (Ansprüche 17-20) bezieht.

**Translation**

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

101070574

Applicant's or agent's file reference TM5100 LG/vm	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08662	International filing date (day/month/year) 05 September 2000 (05.09.00)	Priority date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/56		
Applicant TAD PHARMA GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 March 2001 (12.03.01)	Date of completion of this report 14 December 2001 (14.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08662

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-13, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-23, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1/7 - 7/7, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages 1-3, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08662

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

1). The subject matter of the present application relates to the regulatory sequence, in particular the promoter sequence, of the gene (SEQ ID number 1) for coding the endopolygalacturonase (EPG).

2.1). The present application satisfies the requirements of PCT Article 33(2), since the available prior art is not prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 1-23.

2.2). Document D1 (SIEKSTELE RIMANTAS ET AL: 'Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1)', YEAST, 15-03-1999, pages 311-322) is considered to be the closest prior art in relation to the subject matter of Claim 1. It discloses the coding sequence (D1, Figure 1) for the endopolygalacturonase (EPG).

The subject matter of Claim 1 differs from D1 in that SEQ ID number 1 refers to the -1146 to -1 sequence, which is located 5' from the translation start of the coding sequence for the Kluyveromyces (K.) marxianus endopolygalacturonase. The sequence from SEQ ID number 1 and the sequence described in D1 overlap in a range of 572



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08662

nt.

The present application is understood to address the problem of extending the state of the art by providing further regulatory sequences for yeast.

The subject matter of Claim 1 is considered to be inventive, since the nucleotide sequence of SEQ ID number 1 is not obviously suggested by D1.

Consequently, Claims 1-23 satisfy the requirements of PCT Article 33(3).

Industrial applicability of the subject matter of Claims 1-23 is established; PCT Article 33(4).

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08662

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 4-7 and 17-20 do not meet the requirements of PCT Rule 13bis.3(a) because the date of deposit is not specified with reference to the deposited plasmids/micro-organisms (description, page 5).

Furthermore, the same accession number cannot refer to a plasmid deposit (Claims 4-7) and an E.coli deposit (Claims 17-20) at the same time.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 12 June 2001 (12.06.01)	
International application No. PCT/EP00/08662	Applicant's or agent's file reference TM5100 LG/vm
International filing date (day/month/year) 05 September 2000 (05.09.00)	Priority date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
Applicant BECHER, Dietmar et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:12 March 2001 (12.03.01)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer P. Blanchet (Fax 338.87.40) Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>TM5100 LG/vm</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/08662</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>05/09/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>10/09/1999</b>
Anmelder <b>TAD PHARMA GMBH et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**REGULATORISCHE SEQUENZEN UND EXPRESSIONSKASSETTEN FÜR HEFEN, INSBESONDERE FÜR KLUYVEROMYCES**

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 00/08662

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGS- GEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/56 C12N9/24 C12N15/81

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SIEKSTELE RIMANTAS ET AL: "Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1)." YEAST, Bd. 15, Nr. 4, 15. März 1999 (1999-03-15), Seiten 311-322, XP000981653 ISSN: 0749-503X in der Anmeldung erwähnt ---	
A	BUSSINK H J D ET AL: "CHARACTERIZATION OF POLYGALACTURONASE-OVERPRODUCING ASPERGILLUS-NIGER TRANSFORMANTS" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 37, Nr. 3, 1992, Seiten 324-329, XP002093936 ISSN: 0175-7598 ---	
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

8. Februar 2001

23/02/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BIRD CR ET AL: "The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants"</p> <p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY., Bd. 11, 1988, Seiten 651-662, XP002159864 NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT., NL ISSN: 0167-4412</p> <p>---</p>	
A	<p>NICHOLASS FJ ET AL: "High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions"</p> <p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY., Bd. 28, 1995, Seiten 423-435, XP002159865 NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT., NL ISSN: 0167-4412</p> <p>-----</p>	

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

LEISSLER-GERSTL, G.  
EISENFÜHR, SPEISER & PARTNER

Arnulfstrasse 25  
80335 München  
ALLEMAGNE

EISENFÜHR, SPEISER & PARTNER  
EINGEGANGEN/RECEIVED

17. Dez. 2001

PCT MÜNCHEN

FRIST 27.12.01

## PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

14.12.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
TM5100 LG/vm

**WICHTIGE MITTEILUNG**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP00/08662

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
05/09/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
10/09/1999

Anmelder

TAD PHARMA GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

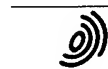
#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas  
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl  
Fax: +31 70 340 - 3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cardenas, C

Tel. +31 70 340-3370




# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts TM5100 LG/vm	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08662	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/56		
Anmelder TAD PHARMA GMBH et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser <b>BERICHT</b> umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht <b>ANLAGEN</b> bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li><li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li><li>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li><li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li><li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li><li>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li><li>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li><li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li></ul>		
Datum der Einreichung des Antrags  12/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  14.12.2001	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Espen, J  Tel. Nr. +31 70 340 2625	





**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-13                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-23                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/7-7/7                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-3, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08662

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-23
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-23
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-23
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der  
erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und  
Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1). Die vorliegende Anmeldung hat als Gegenstand die regulatorische Sequenz, im besonderen die Promotersequenz, des für die Endopolygalakturonase (EPG) kodierenden Gens (SEQ ID Nr. 1).

2.1). Die vorliegende Anmeldung erfüllt die Erfordernisse von Art. 33 (2) PCT, da die zur Verfügung stehende Stand der Technik nicht neuheitsschädlich ist für den Gegenstand der Ansprüche 1-23.

2.2). Dokument D1 (SIEKSTELE RIMANTAS ET AL: 'Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1).', YEAST, 15-03-1999, Seiten 311-322) wird als nächstliegender Stand gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart die für die Endopolygalakturonase (EPG) kodierende Sequenz (D1, Abb. 1).

Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich von D1 dadurch, daß SEQ ID NO 1 sich auf die -1146 bis -1 Sequenz bezieht, welche sich 5' vom Translationsstart der für die Kluyveromyces (K.) marxianus Endopolygalakturonase kodierenden Sequenz befindet. Die Sequenz aus SEQ ID NO 1 und die in D1 beschriebene Sequenz überlappen in einem Bereich von 572 nt.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß weitere regulatorische Sequenzen aus Hefe dem Stand der Technik zur Verfügung gestellt werden.

Der Gegenstand von Anspruch 1 wird als erfinderisch angesehen, da die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO 1 nicht in naheliegender Weise aus D1 ableitbar war.

Daher erfüllen Ansprüche 1-23 die Erfordernisse von Art. 33 (3) PCT.

Die industrielle Anwendbarkeit des Gegenstandes der Ansprüche 1-23 wird anerkannt (Art. 33 (4) PCT).

**Zu Punkt VIII**

**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Die Ansprüche 4-7, und 17-20 erfüllen nicht die Erfordernisse von Regel 13bis.3 (a) PCT, weil in der Bezugnahme auf die hinterlegten Plasmide/Mikroorganismen (Beschreibung, Seite 5) das Datum der Hinterlegung fehlt.

Weiterhin ist es unmöglich, daß die gleiche Hinterlegungsnummer sich gleichzeitig auf ein Plasmid (Ansprüche 4-7) und ein E. coli (Ansprüche 17-20) bezieht.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595

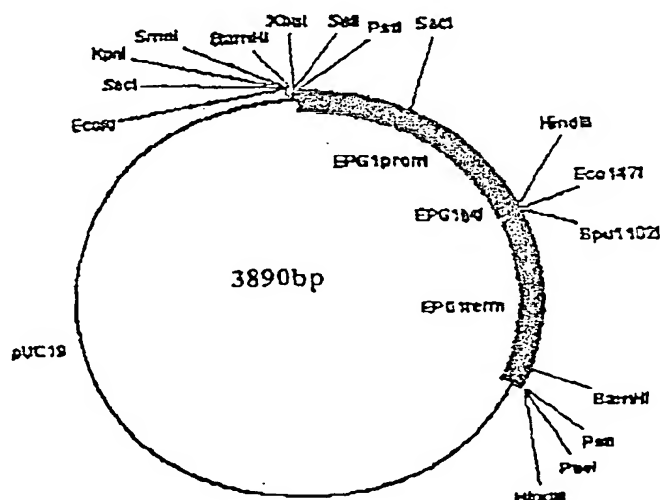
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/20005 A1

PCT

- |   |                |   |
|---|----------------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>1</sup> :<br>9/24, 15/81  | C12N 15/56,    | (72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BECHER, Dietmar [DE/DE]; Darsser Weg 5, 17493 Greifswald (DE). SIEK-STELE, Rimantas [LT/LT]; Gedimino 33/17-22, 200 Vilnius (LT). BARTKEVICIUTE, Danguole [LT/LT]; Kovo 11, 37-31, 4058, Traku distr., Grigiskes (LT). SAS-NAUSKAS, Kestutis [LT/LT]; D. Gerbutavicius 1/42-87, 2050 Vilnius (LT). DÖHNER, Leopold [DE/DE]; Johanna-Stelling-Strasse 1, 17489 Greifswald (DE). SALIM, Salah [DE/DE]; Wolgaster Strasse 120, 17489 Greifswald (DE). |
| (21) Internationales Aktenzeichen:  | PCT/EP00/08662 |   |
| (22) Internationales Anmeldedatum:<br>5. September 2000 (05.09.2000)  |                |   |
| (25) Einreichungssprache:   | Deutsch        |   |
| (26) Veröffentlichungssprache:  | Deutsch        |   |
| (30) Angaben zur Priorität:<br>199 43 383.6 10. September 1999 (10.09.1999)   | DE             | (74) Anwalt: LEISSLER-GERSTL, Gabriele; Eisenfuhr, Speiser & Partner, Arnulfstrasse 25, 80335 München (DE).   |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): TAD PHARMA GMBH [DE/DE]; Heinz-Lohmann-Strasse 5, 27472 Cuxhaven (DE). |                | (81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,   |

*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

- (54) **Bezeichnung:** REGULATORISCHE SEQUENZEN UND EXPRESSIONSKASSETTEN FÜR HEFEN



- (57) Abstract: The invention relates to a DNA sequence which acts as a promoter in yeast cells, to an expression and optionally, secretion system containing said DNA sequence, to plasmids containing this system, to host cells that have been transformed with said DNA and to methods for producing proteins and polypeptides.

- (57) Zusammenfassung: Es werden eine DNA-Sequenz, die als Promotor in Hefezellen aktiv ist, ein dieses enthaltendes Expressions- und gegebenenfalls Sekretionssystem, dieses System enthaltende Plasmide, mit der DNA transformierte Wirtszellen sowie Verfahren zur Herstellung von Proteinen und Polypeptiden beschrieben.

WO 01/20005 A1

MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), caraisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

— Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäß Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

## REGULATORISCHE SEQUENZEN UND EXPRESSIONKASSETTEN FÜR HEFEN

Die Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz, die als Promotor in Hefezellen aktiv ist, ein dieses enthaltendes Expressions- und gegebenenfalls Sekretionssystem, dieses System enthaltende Plasmide, mit der DNA transformierte Wirtszellen sowie Verfahren zur Herstellung von Proteinen und Polypeptiden.

Die Herstellung von Peptiden und Proteinen mit gentechnischen Verfahren ist mittlerweile üblich und es stehen hierfür viele verschiedene Systeme zur Verfügung. Häufig werden Bakteriensysteme verwendet, die allerdings Nachteile haben insbesondere bei der Gewinnung von Medikamenten oder Impfstoffen, z.B. daß sie pyrogene Substanzen erzeugen, die vor der Verwendung entfernt werden müssen, oder daß sie die Polypeptide nicht glykosylieren können. Es wurden daher auch eine Reihe anderer Systeme für die Expression von Polypeptiden in eukaryontischen Zellen entwickelt. Ein hierfür weitverbreiteter Organismus ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren Genom inzwischen bekannt ist und für die Vektoren und Expressionssysteme erhältlich sind. Allerdings hat auch die Verwendung dieses Mikroorganismus Nachteile. So ist *Saccharomyces* zum Beispiel temperaturempfindlich, was aufwendige Einrichtungen zur Temperaturkontrolle bei der Züchtung erfordert.

Eine Gattung, die aufgrund günstiger Eigenschaften für biotechnologische Verfahren in Betracht gezogen wird, ist die Hefe *Kluyveromyces*. Die Arten *K.lactis* und *K.marxianus* werden als GRAS (Generally Recognized As Safe) eingestuft und können daher mit derselben Sicherheit wie *Saccharomyces* verwendet werden. Darüberhinaus kann *K.marxianus* eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen und Energiequellen für das Wachstum nutzen und ist nicht sehr temperaturempfindlich. *Kluyveromyces marxianus* kann bei Temperaturen bis zu 45°C wachsen und läßt sich daher im Gegensatz zu den temperaturempfindlichen *Saccharomyces*-Stämmen einfacher züchten. Die Zellen von schnell wachsenden *K.marxianus*-Stämmen können sich bei optimalen Bedingungen alle 35 Minuten teilen. Allerdings konnten diese guten Eigenschaften bisher nicht optimal ausgenutzt werden, da es für diese Hefeart an zuverlässigen, expressionsstarken variablen Promotoren mangelt und kaum Expressionssysteme zur Verfügung stehen, mit denen Proteine in guter Effektivität hergestellt werden können.

Es war nun Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Promotor, der für die Expression in Hefen, insbesondere Hefezellen der Gattung *Kluyveromyces* geeignet ist, sowie Expressionssysteme, die variabel zur Expression eingesetzt werden können, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst, indem erfindungsgemäß eine DNA-Sequenz, die die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 1

GAGGCCTGTC CGATTATTAA ACTTGCGGCA CCCGAGTTTG TGACCTTCGA  
CGACATGTTT TATTTCCACA CCGTAGCTAC ACTTTCTATG TAGTAAGTAG  
GTAGTATGGA TGGTAGCTAG TAGAACTAA ACGAAACGAA ATAAATGTGA  
AATGTTAGAC GTAAAGGGGA GGGGAAGGGA AGGGGGCGGC GGAGAGACAT  
GCCAAGCCAT GCCATTTTCAT GGCATGGCAT GTCAAGGGAT ACTGCATGCA  
TGCATGCATA CTTTACCAAT AGCAAAGTAA ATTGCTTTCT TCCCCCATT  
GAAACTATTC CACCTCAATC CATCTTTTCT ATAATGGGTA TCACCGATCT  
CATGTGTTCT AATAATGCTG CAGGCAACAA CAAATCTTAA AGGCAACTTG  
GAATGTAATT TGGTTAATGA TAGATATCAA ACAGCAATGG TGGGCTCCAA  
CCGCATGGAT ATGCTCACCT TATTATCCGG AATTGTTGTT CCGCAGGAAA  
AAAAAAAAAAC CTCGAACCAG ATATTAATTA TCCTATCATT ACTGCGTACA  
AAACCCGGGA ACGGTTAACC TGCAGCAGCC GTTTGTCTTA CAGTTCTCAT  
GCACAATCAG CCAGATTTTG CAATAGTATT AACTTAGAAT TAAGGCAACA  
TCTTTGGATA TGCATGTAGA GTAAGTCGTT CGAAACCATT ATTATTATTA  
TTATTATTAT TATTATTATT ATTATTATTA TTATTAGTAT TATTGAAATT  
GTTATTGTTT TTAGTTTTCAC TACTATTATT ATTCATATTC ATGTTATTGA  
CATCGCCGAA CGACCGCCT CCATACCGAT TAGACAGGAT CTAAACGTTG  
GGCTCCAGAG CTCACACATT ATGCTAAATA ACTATCTACT GTAACAGCTA  
CAGAAAAAAA ACTATAAAAG AGCGAGGGAT AAACCACTCT CTTGTGAATC  
AGGATCAGTA GGTAACATCAT AAACCTTCTT CTTTCTCTC AAAATATCAA  
ATAACAGTAG TATCAACAAC GATATCGAAT AATACTAACT ACTACAACAG  
TAGGAACAGT AACGACAACG ACAACGATAG TAACGACAAT AACGACACCA  
ACAAACAACA GGAACACAGA TTAAGCTCAG AAACAAAAAA AAAAAA

umfaßt, zur Verfügung gestellt wird.

Die erfindungsgemäße Nucleotidsequenz umfaßt eine Sequenz, die als Promotor aktiv ist und liefert ein Expressionssystem, das sehr variabel ist und für *Kluyveromyces* geeignet ist, aber auch für andere Hefearten, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden kann.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 ist eine Nucleinsäuresequenz, die regulatorische Regionen eines Gens enthält, das für das Enzym Endopolygalacturonase codiert. Das Enzym Endopolygalacturonase baut Pektin ab, indem es 1,4- $\alpha$ -D-galactosidische Bindungen zwischen zwei nichtmethylierten Galacturonsäureresten spaltet. Dieses Enzym kommt unter anderem in Hefestämmen der Art *Kluyveromyces marxianus* vor. Die Sequenz des Endo-



polygalacturonasegens aus *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* wurde in Yeast 15, 311-322 (1999) veröffentlicht. Die aus der angegebenen Sequenz ableitbare Promotorregion führte jedoch nicht zuverlässig zur Expression verschiedener Proteine.

Es wurde nun gefunden, daß eine Sequenz, die zumindest einen Teil der Nucleotide von SEQ ID Nr. 1, bevorzugt mindestens die Nucleotide 1 bis 1134 und insbesondere die gesamte Sequenz umfaßt, die Expression von Proteinen in sehr vorteilhafter und reproduzierbarer Weise ermöglicht. Die beanspruchte Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 weist mehrere regulatorische Anteile auf, so daß sie unter verschiedensten Bedingungen ihre Funktion als Promotor ausüben kann.

Der erfindungsgemäße Promotor kann durch Zugabe von Pektin zum Kulturmedium induziert werden. Dies ist vorteilhaft, da Pektin eine gut verfügbare Substanz ist und somit ein günstiges Induktionsmittel für das erfindungsgemäße System zur Verfügung steht.

Die beschriebenen Nucleinsäuresequenzen mit regulatorischer Aktivität schließen solche Sequenzen ein, die durch Modifizierung, Substitution, Deletion oder Insertion oder Kombinationen hiervon entstanden sind, die die gleiche oder eine bessere regulatorische Aktivität als der Promotor, der Terminator oder die Signalsequenz besitzen. Hierzu kann auch die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 mit weiteren regulatorischen Upstream-Sequenzen mit Aktivator- und/oder Repressorfunktionen eingeschlossen sein.

Erfindungsgemäß werden weiterhin auch solche Sequenzen in Betracht gezogen, die mit den beanspruchten Nucleotiden oder Sequenzen eine Homologie von mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90% und insbesondere 95% aufweisen, solange sie auch eine vergleichbare Aktivität haben.

Bevorzugt wird die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 in Form eines Expressionssystem bzw. einer Expressionskassette für die Expression von Proteinen und Peptiden bereitgestellt. Die erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt in ihrer einfachsten Form eine regulatorische Sequenz, wie sie in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, oder einen als Promotor aktiven Teil davon, einen Insertionsklonierungsort, in den das Polynucleotid für das zu exprimierende Protein einkloniert werden kann, und die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2,

GCGTCTCT TTTTATTTT TTTTTTTTTT TTATTAACGT GAAGAAGATA  
 AGGGAAGTCT TCAATGCGGT TCTGAATGGT TGATCCATTT CGATACCTCG  
 GGGACTTCCT TTGAATATAT TCTGAGAGTA TGACAGTTGG TTTTCTTTCT  
 TTCTTTCTAT TGTTTTTGT TTTATGGAAA TATAGCTTTG ATGATTTAGG  
 ATATTTTTTG TAGTGAACCA ATACATGCTT GATTAATATA CGTACGAGGT  
 GGGCATTCTA CTCTCATTAT TGGTGTTTTA TTGGAGGGAA AAATTAAATC  
 TAGGAGTATC GTTTAGAGCG CGAACGTAAT ATCCATGTTT TTCTCTTTGA  
 AGAGGTCCCA CCATTGCTTC CCAGATAGCC AGCATTCTTC CATGATATTT  
 TGGCCTTGTT TTGCACTGGT GACACCCTTT CGAACCAAAG ATGTCAAGTG  
 CTGCTGATAC AACCAACCTGT ATTCATACAA TTCTGGATCC ATCAGCTCAC  
 AATCCACAGC TGAAGATACA GAAAATGATA CATGTCTCTG CAG

die die Terminatorsequenzregion des Endopolygalacturonasgens aus *Kluyveromyces marxianus* kodiert. Diese Expressionskassette kann vielfältig verwendet werden. Der Insertionsklonierungsort ist eine Schnittstelle, an der die Sequenz aufgeschnitten werden kann und das Polynucleotid für das gewünschte Protein oder Peptid einligiert werden kann. In dieser einfachsten Form wird nach Induktion bei der Expression das Protein intrazellulär produziert und nicht aus der Zelle ausgeschleust. Es kann dann nach Aufschluß der Zelle in an sich bekannter Weise gewonnen werden. Diese Ausführungsform eignet sich sowohl für kleine Peptide und Proteine, die außerhalb der Zelle instabil sind als auch für Proteine, die generell intrazellulär lokalisiert sind.

In einer weiteren Ausführungsform, die insbesondere für aus der Zelle auszuschleusende Proteine geeignet ist, wird ein erfindungsgemäßes Expressions- und Sekretionssystem verwendet. Dieses System umfaßt in operativer Verbindung die Nucleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 als Terminator und, zwischen diesen beiden Sequenzen, die Signalsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3

ATGT TATTCAGCAA CACCTTATTG ATCGCAGCAG CTAGTGCATT  
 ATTAGCTGAA GCTTCTCCAT TGGAAAAGAG A

zum Ausschleusen des Proteins. In dieser Ausführungsform erfolgt die Züchtung in an sich bekannter Weise, wobei entweder in einem kontinuierlichen Verfahren das Protein ständig ins Medium abgegeben wird und aus der Fermentationsbrühe kontinuierlich gewonnen werden kann oder in einem diskontinuierlichen Verfahren die Zellen gezüchtet, geerntet und dann das Protein aus der Brühe gewonnen werden kann.

Die erfindungsgemäße Expressionskassett eignet sich sowohl zur Expression von geeigneten sich autonom replizierenden Plasmid n als auch zum Einbau in Hefechromosomen über integrative Vektoren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die in den Figuren 1 bis 3 näher erläuterten Plasmide pEPG1-1, pEPG1-2 und pEPGsec, die die erfindungsgemäßen Expressionssysteme enthalten. Diese Plasmide sind rekombinante bakterielle Plasmide und können in der vorliegenden Form zur Amplifikation der Expressionskassetten verwendet werden. Die Plasmide sind in den Mikroorganismen DSM 12919, DSM 12920, DSM 12921 oder DSM 12922\* enthalten und sind mit diesen hinterlegt.

Es ist jedoch bevorzugt, die Plasmide, nachdem das gewünschte Polynucleotid zur Expression eines Peptids oder Proteins einligiert wurde, in *E. coli* zu amplifizieren, dann die Plasmide zu gewinnen, die Expressionskassette mit geeigneten Restriktionsendonucleasen, für die Schnittstellen an den Rändern der Expressionskassette vorgesehen sind, auszuschneiden und die Expressionskassette in einen Hefvektor einzuligieren. Die Vektoren enthalten üblicherweise Selektionsmarker, um erfolgreich transformierte Zellen in an sich bekannter Weise selektieren zu können.

Die Plasmide können gegebenenfalls in *E. coli* vermehrt und dann in *Kluyveromyces marxianus* oder einen anderen *Kluyveromyces*-Stamm oder auch einen anderen Hefestamm eingesetzt werden. Als Transformationssystem können beispielsweise bekannte Plasmide auf Basis des *Kluyveromyces drosophilae*-Plasmides pKD1 verwendet werden. Abkömmlinge dieses Plasmids eignen sich zur Verwendung in *Kluyveromyces marxianus* und führen bei Verwendung des erfindungsgemäßen Expressionssystems zu einer effektiven Expression und Sekretion von Fremdproteinen im entsprechenden Wirt.

In einer anderen Ausführungsform kann aus den erfindungsgemäßen, wie oben vorbereiteten Plasmiden die Expressionskassette einschließlich des zu exprimierenden Polynucleotids herausgeschnitten und als linearer oder zirkularisierter DNA-Strang als Integrationskassette direkt mit Hefezellen in Kontakt gebracht werden, um von diesen aufgenommen zu werden. Aufgrund der Homologie mit dem Endopolygalacturonasegen wird dann in einem Teil der behandelten Zellen die DNA in das entsprechende Chromosom durch Austausch mit dem Endogalacturonase-Gen aufgenommen. Die Selektion erfolgreich transfizierter Hefe-

\*Hinterlegt bei DSMZ, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig

zellen erfolgt bei dieser Ausführungsform über die unterschiedliche Verwertung von Pektin.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette wird stabil in Chromosomen eingebaut und führt, wenn die Zellen unter optimalen Bedingungen gezüchtet werden, zu einer guten Ausbeute des gewünschten Proteins. Abhängig von der Art des zu exprimierenden Proteins oder Peptids kann die Kopienzahl des Systems eingestellt werden. Da das Endopolygalacturonasegen in dem Chromosomensatz der Hefe nur einfach vorhanden ist, wird bei einer Transfektion oder Transformation mit dem erfindungsgemäß bereitgestellten Expressionssystem auch nur pro erfolgreich transformierter Zelle eine Kopie des Expressionsvektors vorhanden sein. Falls eine höhere Kopienzahl erwünscht ist, werden in an sich bekannter Weise an die Enden der Expressionskassette Sequenzen eines in größerer Kopienzahl in dem Chromosomensatz vorliegenden Gens, z.B. für rDNA, anligiert, um eine höhere Anzahl an Austauschereignissen zu bewirken.

Im letzteren Fall wird in an sich bekannter Weise zusätzlich noch ein Marker in die Sequenz miteingebaut, damit die erfolgreich transformierten Zellen selektiert werden können. Verfahren und hierzu geeignete Marker sind dem Fachmann bekannt und bedürfen hier keiner näheren Erläuterung.

Das erfindungsgemäße System ist sehr variabel. So kann z.B. nur die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein als Promotor aktiver Teil davon zusammen mit anderen Nucleinsäuresequenzen, die weitere regulatorische Sequenzen bereitstellen, und mit einer heterologen Nucleotidsequenz kombiniert werden. Es kann die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein als Promotor aktiver Teil davon mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 2 kombiniert werden, um ein in *Kluyveromyces marxianus* homologes regulatorisches System bereitzustellen, in das das Polynucleotid für das zu exprimierende Protein eingesetzt wird oder aber es kann ein System aus SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2 und SEQ ID Nr. 3 zusammen mit einem zu exprimierenden Gen, das ein gewünschtes Protein kodiert, kombiniert werden, um ein in die Kultur abzugebendes Produkt zu erzeugen. Da *Kluyveromyces*-Zellen mit vielen verschiedenen C-Quellen wachsen können und bezüglich weiterer Nährstoffe nicht sehr anspruchsvoll sind, darüber hinaus temperaturunempfindlich sind, wird hier ein sehr effektives System bereitgestellt. Die zuverlässige Expression der Fremdproteine wird durch die erfindungsgemäß bereitgestellte regulatorische Sequenz der Erfindung erreicht.

Erfindungsgemäß wird ein System bereitgestellt, das es zuläßt, die aufgrund ihrer außergewöhnlichen physiologischen Leistungen als Wirt vielversprechende Hefeart *Kluyveromyces marxianus* zu nutzen.

Das erfindungsgemäße System eignet sich zur Expression von Peptiden, Polypeptiden, Proteinen und Hybridmolekülen einschließlich glycosylierter Proteine.

So kann in einer weiteren Ausführungsform die Expressionskassette auch die vollständige Sequenz des Endopolygalacturonaseenzyms oder Teile davon enthalten, wobei zwischen das Endopolygalacturonasegen und die Terminatorsequenz eine Sequenz für ein gewünschtes Protein einligiert ist. Bei dieser Ausführungsform wird dann bei der Expression ein Hybrid erhalten, von dem in an sich bekannter Weise die Endopolygalacturonase abgespalten wird.

Im folgenden werden einige Definitionen für Begriffe angegeben, die in der Beschreibung verwendet werden.

Danach ist ein "Expressionsvektor" ein DNA-Molekül, das linear oder ringförmig sein kann und ein Segment enthält, das eine Sequenz für ein interessierendes Protein oder Peptid codiert, das operativ verbunden ist mit regulatorischen Sequenzen. Diese regulatorischen Sequenzen schließen mindestens Promotor- und Terminatorsequenzen ein. Der Expressionsvektor kann zusätzlich selektierbare Marker und weitere regulatorische Elemente enthalten und muß die Übertragung und Vermehrung in Wirtszellen ermöglichen. Die Replikation der Expressionsvektoren kann autonom oder durch Integration in das Wirtsgenom erfolgen.

Der Ausdruck "DNA" oder "Polynucleotid" schließt polymere Formen von Desoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden beliebiger Länge und beliebiger Modifikation in einzel- und doppelsträngiger Form ein.

Der Ausdruck "operativ verbunden" bedeutet, daß die einzelnen Segmente so angeordnet sind, daß sie dem vorgesehenen Zweck dienen, d.h. die Transkription initiieren können und die Expression fördern können von dem Replikationsstartpunkt bis zur Terminationssequenz.

Die beanspruchten Sequenzen können weitere kurze Sequenzen aufweisen, die die biologische Aktivität des Moleküls nicht stören. Weiterhin umfassen die beanspruchten Sequenzen auch allelische Varianten der Sequenz, d.h. alternative Formen des Gens, die durch Mutation entstanden sind.

Der Begriff "Protein oder Peptid" bezieht sich auf eine molekulare Kette von Aminosäuren mit biologischer Aktivität. Die Proteine und/oder Polypeptide können in vivo oder in vitro modifiziert werden, z.B. durch Glycosylierung und Phosphorylierung. Unter Hybridmolekülen werden Moleküle verstanden, die sowohl homologe Teile als auch heterologe Teile umfassen, z.B. solche Proteine, die eine Kombination aus Endopolygalacturonase oder Teilen davon mit einem Fremdprotein umfassen, oder z.B. Nucleotidsequenzen, bei denen DNA aus *Kluyveromyces marxianus* mit DNA aus anderen Mikroorganismen kombiniert ist.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette ist unter anderem für Hefen der Stämme *Kluyveromyces* und *Saccharomyces* geeignet und wird bevorzugt in Hefestämmen der Art *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* verwendet. Ein besonders bevorzugter Stamm mit besonders günstigen Expressionseigenschaften ist *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* BKM Y-719, der bei Siekstele et al. 1999 (Yeast 15, 311 bis 322 (1999)) beschrieben wurde.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Hefezelle mit einem sich autonom replizierenden Plasmid, das eine erfindungsgemäße Expressionskassette und ein Polynucleotid, das ein Fremdprotein kodiert, umfaßt, transfiziert oder transformiert, die Hefezelle unter Bedingungen, die zur Expression des Fremdproteins geeignet sind, züchtet und das Protein gewinnt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine erfindungsgemäße Expressionskassette in eine Hefezelle bringt, wo die Expressionskassette in ein Chromosom eingebaut wird, die Zelle züchtet und anschließend das Protein gewinnt. Besonders bevorzugt wird die erfindungsgemäße Expressionskassette als Modul eingesetzt das die Konstruktion von episomalen oder integrativen Expressionsvektoren, die die regulatorischen Sequenzen gemäß SEQ ID Nr. 1, 2 und/oder 3 enthalten, ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Expressionssystem ist geeignet zur Expression verschiedener heterologer Proteine. Besonders bevorzugt wird das System verwandt zur Expression von HBVS-Antigen (Hepatitis-B-Virus, Surface-Antigen) und Virusprotein 1 aus Polyoma-Virus. Diese Proteine sind antigene Proteine und können besonders vorteilhaft als Impfstoffe eingesetzt werden.

Die Erfindung wird durch die beigefügten Figuren und die folgenden Beispiele erläutert.

Die Figuren 1 bis 4 zeigen Plasmide mit den erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Figur 5 zeigt die in Beispiel 2 verwendeten Primer.

Fig. 1 zeigt das Plasmid pEPG1-1. Dieses Plasmid enthält eine Expressionskassette mit dem erfindungsgemäßen Promotor gemäß SEQ ID Nr. 1 (als EPG1prom bezeichnet), einem Insertionsklonierungsort, der mit BspT1 geschnitten werden kann, und der erfindungsgemäßen Terminatorsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 (als EPG1term bezeichnet). Diese Expressionskassette wurde in den Multicloning Site des Plasmids pUC19 einligiert. Der Insertionsklonierungsort, der mit BspT1 geschnitten werden kann, ersetzt den offenen Leserahmen des Endopolygalacturonasegens, das entfernt wurde.

Fig. 2 zeigt das Plasmid pEPG1-2. Dieses Plasmid enthält die erfindungsgemäße Expressionskassette, die eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 mit den Nucleotiden 572 bis 1134 (mit EPG1prom bezeichnet), die als Promotor aktiv ist, einen Insertionsklonierungsort, der mit BspT1 geschnitten werden kann, und eine Terminatorsequenz, die die Nucleotide 28 bis 541 von SEQ ID Nr. 2 (als EPG1term bezeichnet) umfaßt. Der Insertionsklonierungsort ersetzt den offenen Leserahmen des Endopolygalacturonasegens einschließlich der Sequenzen -1 bis -12 und 1087 bis 1115 dieses Gens.

Fig. 3 zeigt das Plasmid pEPGsec. Dieses Plasmid enthält ein Expressions- und Sekretionssystem der Erfindung. Das Plasmid enthält eine Expressionskassette mit einem Promotor gemäß SEQ ID Nr. 1 (als EPG1prom bezeichnet), einem Terminator gemäß SEQ ID Nr. 2 (als EPG1term bezeichnet), einer Signalsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 (als EOG1lyd bezeichnet) und zwei Schnittstellen, um die gewünschte Nucleinsäuresequenz für das zu exprimierende Protein einzusetzen. Diese Expressionskassette wurde in den Multicloning Site des Plasmids pUC19 einligiert. Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasegens wurde von der Position 75 bis 1084 entfernt und durch einen Linker mit den Klonierungsorten Eco 147I und BpU 1102I ersetzt.

Figur 4 zeigt das Plasmid pUC19PG. Ein 2,198 kb PstI-DNA-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12-Bakteriophagen einer genomischen Genbank von *Kluyveromyces marxianus* wurde in den PstI-Restriktionssort des Multicloning Site des Plasmids pUC19 ligiert.

Fig. 5 zeigt das Plasmid pUC19-PG1a. Ein 2,735 kb großes Stul-Pvull-DNA-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12-Bakteriophagen einer genomischen Genbank von *Kluyveromyces marxianus* wurde im Plasmid pUC19 gegen das 321 kb große Fragment ausgetauscht. Der fett gedruckte Teil des Plasmids entspricht dem DNA-Fragment aus *K.marxianus*, der dünn gedruckte Teil stellt den Anteil des Plasmids pUC19 dar.

Figur 6 zeigt die für die Klonierung von Promotor und Signalsequenz verwendeten Primer gemäß SEQ ID Nr. 4 und 5.

Figur 7 zeigt die Signalsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 und das zugehörige Signalpeptid (mit Sequenz für Pre- und Prepropeptid) der Endopolygalacturonase aus *Kluyveromyces marxianus*.

Bei der DSMZ wurden 4 Mikroorganismen gemäß den Anforderungen des Budapester Vertrags hinterlegt, die die Plasmide gemäß Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 und Fig. 4 enthalten. Es sind dies *E. coli* pEPG1-1, hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 12919, *E. coli* pUC19PG, hinterlegt DSM 12920, *E. coli* pEPGseq, hinterlegt mit der Nummer DSM 12921 und *E. coli* pEPG1-2 mit der Hinterlegungsnummer DSM 12922.

### Beispiel 1

#### Herstellung des Grundplasmids zur Erzeugung der Expressionskassetten

Ein PstI-DNA-Fragment mit 2,198 kb, das das komplette Gen der Endopolygalacturonase (EPG1) mit den regulatorischen Sequenzen enthält, wurde in die PstI-Schnittstelle des Multicloning Site des bakteriellen Plasmides pUC19 inseriert. In Fig. 4 ist dieses Konstrukt dargestellt. Unter Verwendung von jeweils zwei entgegengesetzten Primern, die am 5'-Ende einen Erkennungsort für das Restriktionsenzym BstT1 trugen und am 3'-Ende Homologie mit der Promotor-, Signal- und/oder der Terminatorsequenz des EPG1-Gens aufwiesen, konnte mittels um das Plasmid umlaufender PCR ein DNA-Fragment erzeugt werden, das nach Restriktion mit BspT1 mit einer Ligase zirkularisiert werden konnte. Bei Verwendung verschiedener Erkennungsorte für Restriktionsenzyme an den 5'-Enden der PCR-Primer mußten zur Zirkularisationsligation entsprechende Linker einligiert werden oder die Primer enthielten zusätzliche Sequenzen am 5'-Ende,



die einen gemeinsamen Erkennungsort für das Restriktionsenzym darstellten. Je nach Auswahl der Primer können definierte Bereiche der EPG1-Region durch Restriktion und anschließende Zirkularisierung aus dem Plasmid deletiert werden. Die rekombinanten Deletionsplasmide wurden in *Escherichia coli* amplifiziert und dienten als Grundlage für die Expressionskassetten. Über die verschiedenen Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme im Multicloning Site des Plasmids pUC19 kann dann die Kasette ausgeschnitten und in einen episomalen oder integrativen Vektor für einen entsprechenden Hefestamm kloniert werden. Die Kasette kann auch direkt als PstI-DNA-Fragment zur Integration in einen Hefewirtstamm verwendet werden.

### Beispiel 2

#### Herstellung eines rekombinanten Plasmides mit Sequenz ID Nr.1, Nr.2 und Nr.3

Im bakteriellen Grundplasmid pUC19 wurde das 321bp lange PvuII Fragment gegen ein StuI/PvuII DNA Fragment von 2,735 kb, das das komplette Endopolygalacturonasegen, einschließlich der regulatorischen Sequenzen -1142 bis -1 und +1087 bis 1595 aus *Kluyveromyces marxianus* enthält, ausgetauscht. Das StuI/PvuII Fragment wurde dazu aus einem rekombinanten Lambda GEM™-12 Bakteriophagen einer genomischen Genbank von *Kluyveromyces marxianus* isoliert. Eine Karte des erzeugten Plasmides: „pUC19-PG1a“ ist in Figur Nr. 5 dargestellt. Dieses Plasmid kann in analoger Weise zum Beispiel 1 für die Erzeugung von Expressionskassetten verwendet werden. Da durch die Klonierungsstrategie bei diesem Plasmid der Multicloning Site komplett deletiert wurde und der StuI Ort im Upstream-Promotorbereich des EPG1 Gens durch Ligation mit dem PvuII Ort im pUC19 zerstört wurde, können zum Ausschneiden der Kasette der downstream zum EPG1 Gen verbliebene PvuII Ort und z.B. der unikale NarI Ort im lacZ-Teil des pUC19 verwendet werden.

Mit Hilfe der PCR und unter Verwendung der in Figur Nr.6 dargestellten Primer (SEQ ID Nr. 4 und 5) kann ein DNA Fragment generiert werden, das die Promotorregion und die Signalsequenz nach SEQ ID Nr.1 und Nr.3 enthält. Der degenerierte rPEPG Primer hat im 5' Bereich ein Mismatch zur EPG1 Sequenz im Bereich 1220 und generiert dadurch aus der EPG1 Sequenz: CAGTTG einen PvuII Ort (CAGCTG). Diese Punktmutation (Transition) führt zu einem Aminosäureaustausch, indem ein Cystein-Codon von TGT in ein Arginin-Codon nach CGT verändert wird. Dieser Austausch befindet sich aber im Anteil der Endopolygalacturonase, der durch den Leserahmen eines Fremdgenes ersetzt wird und hat somit keinen Einfluß auf die Expression. Das StuI/PvuII PCR-

Fragment kann als blunt End in den Multicloning Site eines entsprechenden Vectors inseriert werden. Über den PvuII Ort können „in Frame“ offene Leserahmen von Genen angefügt werden, deren Expressionsprodukt aus der Zelle ausgeschleust werden soll.

### Beispiel 3

#### Herstellung von Polyoma JCV MAJOR COAT PROTEIN VP1:

Für die Expression des JCV VP1-Gens wurde die Expressionskassette pEPG1-1 verwendet. Das VP1Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer:

JC5 (SEQ ID NR.6): 5'TCAAGCTTAAGAATGGCCCCAACAAAAAGA 3'

und

JC3 (SEQ ID NR. 7): 5'GTAAGCTTAAGATTACAGCATTTTGTCTG 3'

amplifiziert und als *Bsp*TI Fragment in die Expressionskassette von pEPG1-1 inkloniert. Die Kassette wurde mit *Pst*I aufgespalten und die DNA-Fragmente an ihren Enden mittels T4-Polymerase zu stumpfen Enden umgebaut.

Die „blunt ended“ Kassette wurden in den *Sma*I Ort des *Kluyveromyces* Vektors pKDSU inseriert. Die Transkriptionsrichtung des VP1-Gens ist dabei entgegengesetzt zur Transkription des *S.cerevisiae* URA3 Gens.

Der Rezipient (BKM Y-719 *ura*) wurde mit dem Expressionskonstrukt transformiert und Uracil prototrophe Klone wurden isoliert. Das Vorhandensein der Expressionskassette mit dem Leserahmen des VP1 Gens wurde mittels PCR und den oben gezeigten Primern überprüft. Ausgewählte Klone wurden in verschiedenen flüssigen Medien kultiviert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Lysis Puffer (10mM TRIS-HCl, pH7.5, 0,01%TRITON X100, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl mit 1mM PMSF) mit Mikroglasskugeln bei 0°C aufgebrochen. Die Glaskugeln wurden anschließend durch Zentrifugation (2000 rpm) für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde auf ein 20%iges Saccharosekissen (in Lysispuffer) geschichtet und 2 Stunden bei 4°C und 35000rpm (Beckman L8-75 rotor SW41) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer suspendiert und auf einen CsCl-Gradienten (1,24 bis 1,38 g/ml CsCl) geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C, 35000rpm für 16 Stunden im SW41 Rotor. „Virus like Particles“ des JCV VP1 mit einer durchschnittlichen

Partikelgröße von 45nm wurden aus den Fraktionen zwischen 1,3 und 1,34g/ml CsCl gewonnen.

#### Beispiel 4

##### Herstellung von Hepatitis BVirus Surface-Antigen (HBV s-Antigen):

Für die Expression des HBV s-Antigen Gens des Subtyps (AYW) wurden die Expressionskassetten pEPG1-1 und pEPG1-2 verwendet. Das HBS Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer:

HB5 (SEQ ID Nr. 8) : 5'AGCCTTAAGATAATGGAGAACATCACATCAGG 3'

und

HB3 SEQ ID Nr. 9): 5'TGACTTAAGTTAAATGTATACCCAAAG 3'

amplifiziert und als *Bsp*TI Fragment in die Expressionskassetten einkloniert. Die Kassetten wurden mit *Bam*HI aufgespalten und die DNA-Fragmente an ihren Enden mittels Klenow-Polymerase zu stumpfen Enden aufgefüllt.

Die „blunt ended“ Expressionskassetten wurden in den *Sma*I Ort des Kluyveromyces Vektors pKDSU inseriert. Die Transkriptionsrichtung des HBS-Gens ist dabei entgegengesetzt zur Transkription des *S.cerevisiae* URA3 Gens. Der Rezipient (BKM Y-719 ura) wurde mit den Expressionskonstrukten transformiert und Uracil prototrophe Klone wurden auf Selektivmedium isoliert. Von ausgewählten Klonen wurde Gesamt-DNA isoliert und diese zum Nachweis der Expressionskassette mittels PCR eingesetzt. Positive Klone wurden in flüssigen, synthetischen und in Komplet Medien kultiviert und zur Erzeugung von S-Proteinpartikeln eingesetzt. Entsprechende Hefekulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und in PBS Puffer mit 1mM PMSF mit Mikroglasskugeln bei 0°C aufgebrochen. Die Glaskugeln wurden anschließend durch Zentrifugation (2000 rpm) für 10 Minuten sedimentiert. Aus dem Überstand wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm (J20 Rotor Beckman J2-21) die Hefemembranfraktion sedimentiert. HBV s-Antigen sedimentierte mit dieser Fraktion und wurde durch 0,5% Tween-20 in PBS aus der Fraktion eluiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000rpm wurde der Überstand gewonnen und durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Hochgereinigte HBV s-Antigenpartikel wurden aus der 1.2g/ml CsCl Fraktion isoliert.

Die Ausbeute an isolierbarem Antigen war bei Kultivierung in synthetischen Medien mit der pEPG1-2 Kassette zweifach höher als mit der pEPG1-1 Kassette.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz umfassend die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1.
2. Hefeexpressionssystem enthaltend in operativer Verbindung die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, eine Insertionsklonierungsstelle und die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 2 oder einen als Terminator aktiven Teil davon.
3. Hefeexpressions- und Sekretionssystem umfassend in operativer Verbindung eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 3, eine Insertionsklonierungsstelle und die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 2 oder einen als Terminator aktiven Teil davon.
4. Plasmid pEPG1-1 enthaltend eine Hefeexpressionskassette gemäß Anspruch 2 hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. DSM 12919.
5. Plasmid pEPG1-2 enthaltend eine Hefeexpressionskassette gemäß Anspruch 2 hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. DSM 12922.
6. Plasmid pUC19PG hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. 12920.
7. Plasmid pEPGsec enthaltend eine Hefeexpressionskassette gemäß Anspruch 3 hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. DSM 12921.
8. Expressionsvektor enthaltend in operativer Verbindung einen Promotor mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, ein Polynucleotid, das ein Fremdprotein kodiert, und eine Terminatorsequenz.
9. Expressionsvektor nach Anspruch 8, der zusätzlich noch eine Signalsequenz zwischen Promotor und Polynucleotid enthält.
10. Expressionsvektor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalsequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 ist.

11. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynucleotid ein antigenes Protein oder Peptid kodiert.
12. Expressionsvektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynucleotid ein Hepatitis-B-Surface-Antigen, VP1 aus Polyoma-Virus oder Protein A aus Staphylococcus kodiert.
13. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein integrativer oder episomaler Vektor ist.
14. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein in Hefe replizierbares Plasmid ist.
15. Wirtszelle transformiert mit einem Expressionsvektor oder einem Plasmid nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zelle der Art *Kluyveromyces marxianus* ist.
17. *E. coli* pEPG1-1 hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12919.
18. *E. coli* pUC19PG hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12920.
19. *E. coli* pEPGSeq hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12921.
20. *E. coli* pEPG1-2 hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12922.
21. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hefezelle mit einem Plasmid, das die Expressionskassette nach einem der Ansprüche 2 oder 3 und ein Polynucleotid, das ein Fremdprotein kodiert, umfaßt, transfiziert oder transformiert, die Hefezelle unter Bedingungen, die zur Expression des Fremdproteins geeignet sind, züchtet und das Protein gewinnt.

22. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette gemäß Anspruch 2 oder Anspruch 3 in eine Hefezelle bringt, wo die Expressionskassette in ein Chromosom eingebaut wird, die Zelle züchtet und anschließend das Protein gewinnt.
23. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 als Promotor zur Expression von Fremdprotein in Hefezellen.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; TAD Pharmazeutisches Werk

<120> Regulatorische Sequenzen und Expressionskassetten für  
Hefen

&lt;130&gt; TM5071

&lt;140&gt; TM5071

&lt;141&gt; 1999-09-10

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1146

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces marxianus

&lt;400&gt; 1

```
gaggcctgtc cgattattaa acttgcgga cccgagtttg tgaccttcca cgacatgttt 60
tatttccaca ccgtagctac actttctatg tagtaagtag gtagtatgga tggtagctag 120
tagaaactaa acgaaacgaa ataatgtga aatgttagac gtaaaggga ggggaaggga 180
agggggcggc ggagagacat gccaaagccat gccatttcat ggcatggcat gtcaagggat 240
actgcatgca tgcattgata ctttaccat agcaaagtaa attgctttct tccccattt 300
gaaactatc cactcaatc catcttttct ataattggga tcaccgatct catgtgttct 360
aataatgctg caggcaacaa caaatcttaa aggcaacttg gaatgtaatt tggtaaatga 420
tagatatcaa acagcaatgg tgggtccaa ccgcatggat atgtcacct tattatccgg 480
aattgttgtt ccgcaggaaa aaaaaaaaaac ctgcaaccag atattaatta tctatcatt 540
actgctgaca aaaccggga acggtaacc tgcagcagcc gttttgctta cagttctcat 600
gcacaatcag ccagattttg caatagtatt aacttagaat taaggcaaca tctttggata 660
tgcattgata gtaagtcgtt cgaaccatt attattatta ttattattat tattattatt 720
attattatta ttattagtat tattgaaatt gttattgttc ttagtttcac tactattatt 780
attcatatc atgttattga catcgccgaa cgaccagcct ccataccgat tagacaggat 840
ctcaaacgtg ggctccagag ctcaacatt atgctaata actatctact gtaacagcta 900
cagaaaaaaa actataaaag agcgagggat aaaccactct cttgtgaatc aggatcagta 960
ggtaactcat aaaccttctt cttttctctc aaaaatacaa ataacagtag tatcaacaac 1020
gatatcgat aataactaact actacaacag taggaacagt aacgacaacg acaacgatag 1080
taacgacaat aacgacacca acaacaaca ggaacacaga ttaagctcag aaacaaaaaa 1140
aaaaaa 1146
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 541

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces marxianus

&lt;400&gt; 2

gcgtctcttt ttattttttt tttttttttt attaacgtga agaagataag ggaagtcttc 60  
aatgcggttc tgaatgggtg atccatttcg atacctcggg gacttccttc gaatatattc 120  
tgagagtatg acagttgggt ttctttcttt ctttctattg tttttgtttt tatggaaata 180  
tagctttgat gatttaggat attttttgta gtgaaccaat acatgcttga ttaatatatg 240  
tacgaggtgg gcattctact ctcatattg gtgttttatt ggagggaaaa attaaatcta 300  
ggagtatcgt ttagagcgcg aacgtaatat ccatgttctt ctctttgaag aggtccacc 360  
attgcttccc agatagccag cattcttcca tgatattttg cgcttggttt gcactgggtga 420  
caccctttcg aaccaaagat gtcaagtgtc gctgatacaa caacctgtat tcatacaatt 480  
ctggatccat cagctcacia tccacagctg aagatacaga aatgatata tgtctctgca 540  
g 541

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces marxianus

&lt;400&gt; 3

atgttattca gcaacacctt attgatcgca gcagctagtg cattattagc tgaagcttct 60  
ccattggaaa agaga 75

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces marxianus

&lt;400&gt; 4

ttaacagctg tctctctttt ccaatggaga agc 33

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces marxianus

&lt;400&gt; 5

ttaagaggcc tgtccgatta taaacttgcg gc 32

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Polyomavirus sp.

&lt;400&gt; 6



tcaagcttaa gaatggcccacaaaaaga

30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Polyomavirus sp.

&lt;400&gt; 7

gtaagcttaa gattacagca tttttgtctg

30

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 8

agccttaaga taatggagaa catcacatca gg

32

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 9

tgacttaagt taaatgtata cccaaag

27

Expressionskassette mit BspII Insertions-Klonierungsort ligiert in den Multicloning Site des Plasmides pUC19  
Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasgens wurde entfernt.

pEPG1-1

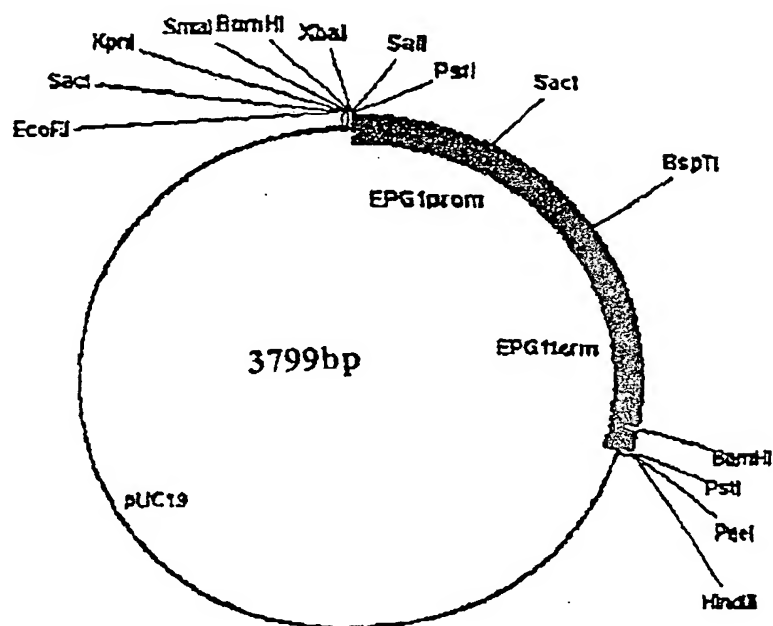
gaacaaaaaATG...(ORF EPG)...TAAGcggtctctttt

↓  
1/1083

gaacaaaaaACTTAAGcggtctctttt

↑  
BspII

Fig. 1



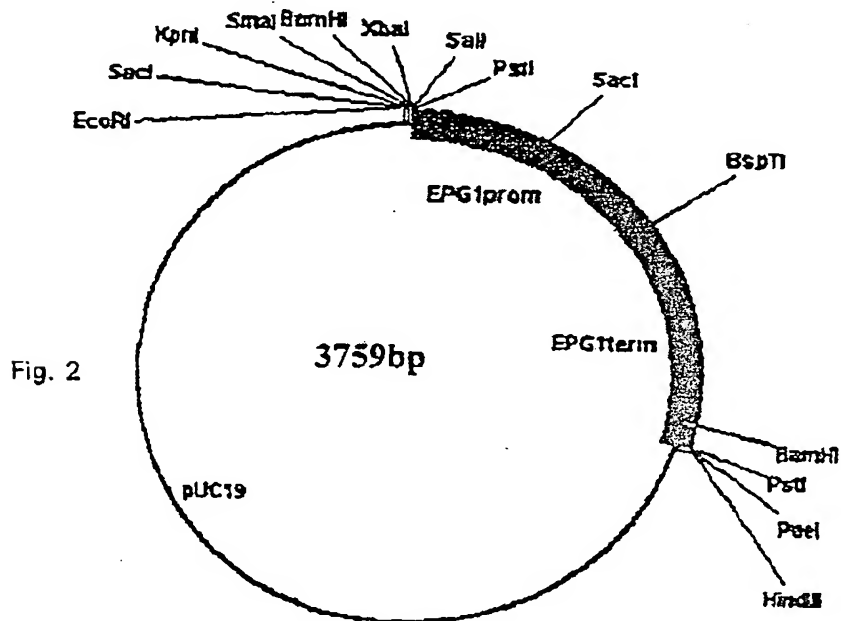
Expressionskassette mit BspTI Insertions-Klonierungsort ligiert in den Multicloning Site des Plasmides pUC19. Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasegens einschließlich der Sequenzen von -1 bis -12 und 1087 bis 1115 wurden entfernt und durch einen BspTI Klonierungsort ersetzt.

### pEPG1-2

-32 cacagattaa gctcagaaaC(aaaaaaaaaa aa ATG...ORF EPG...TAA gc gctctctttt attttttt tttttt)Tat taacgtgaag aag

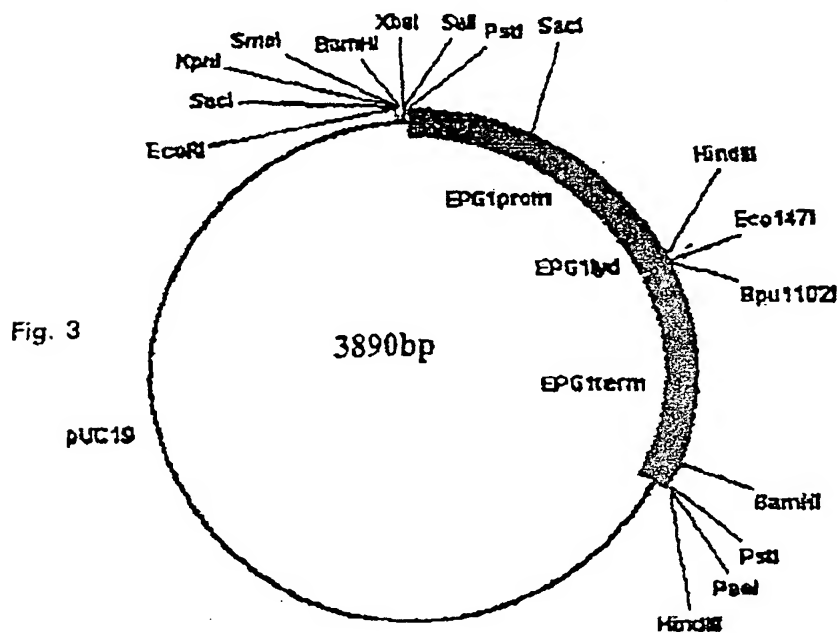
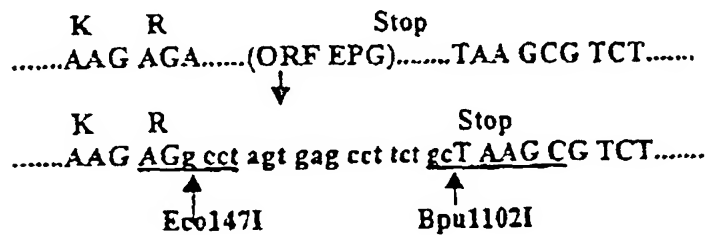
.....cacagattaa gctcagaaaCTTAAG Tat taacgtgaag aag.....

↑  
BspTI



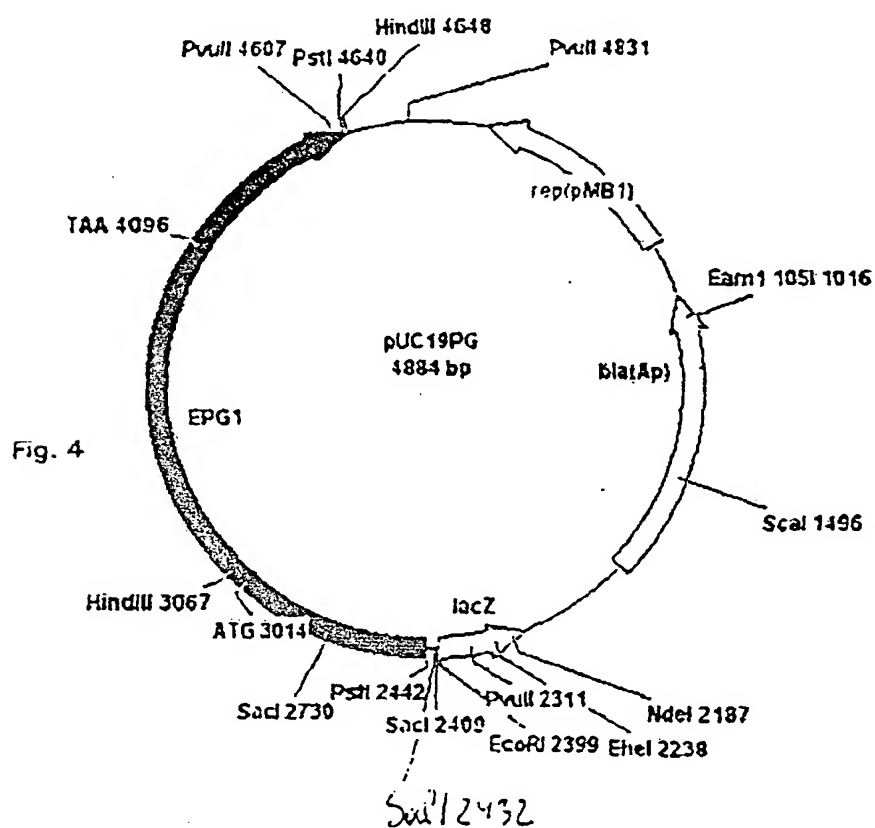
Expressionskassette mit Sekretionssignalsequenz ligiert in den Multicloning Site des Plasmides pUC19.  
Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasgens wurde von der Position 75 bis 1084 entfernt und durch einen Linker mit den Klonierungsorten Eco147I und Bpu1102I ersetzt.

### pEPGsec1



## Plasmid pUC19PG

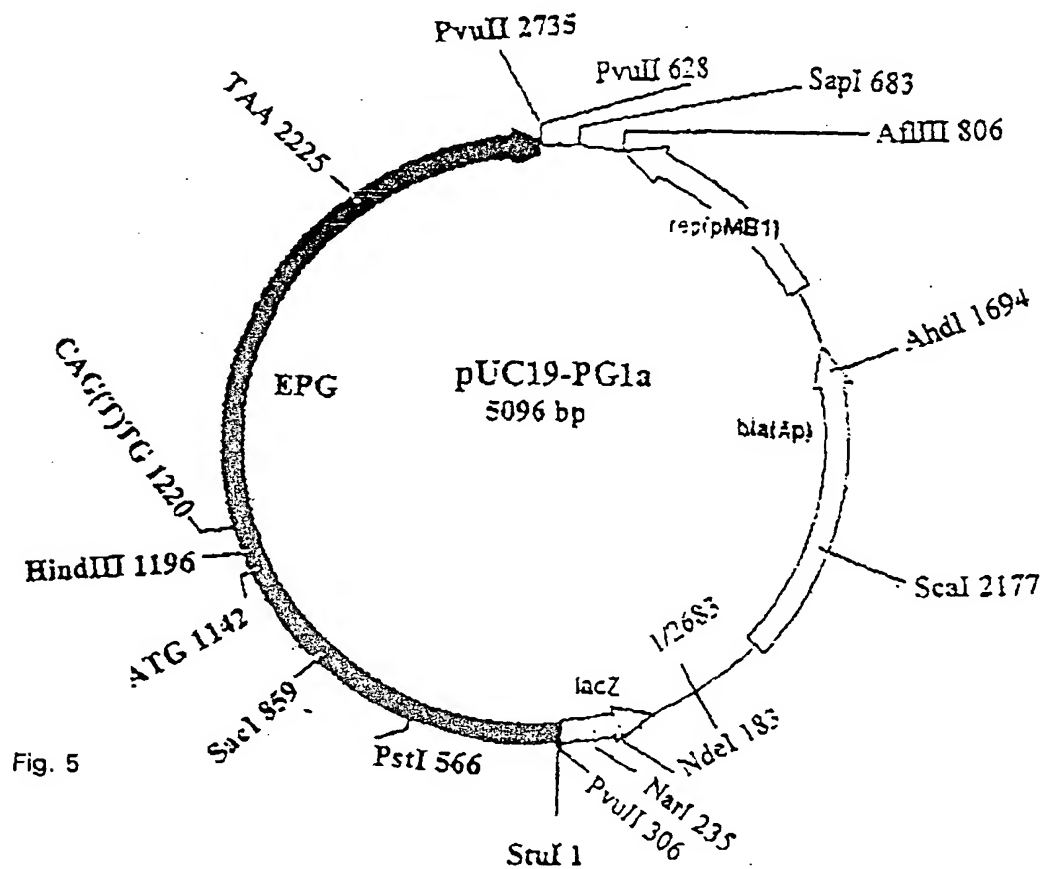
Ein 2,198kb großes PstI DNS-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12 der *Kluyveromyces marxianus* Genbank wurde in den PstI Restriktionsort des Multicloning Site des Plasmides pUC19 ligiert.



**Plasmid pUC19-PG1a:**

Ein 2,735 kb großes *Stu*I-PvuII DNS-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12 der *Kluyveromyces marxianus* Genbank wurde im Plasmid pUC19 gegen das 321bp große PvuII Fragment ausgetauscht.

Der fett gedruckte Teil entspricht dem DNS-Fragment aus *K. marxianus*. Der dünn gedruckte Teil stellt den Anteil des Plasmides pUC19 dar.



PCR-Primer für die blunt End Klonierung von Promotor und  
Signalsequenz des *EPG1* Gens aus *Kluyveromyces marxianus*

rPEPG: 5'TTAACCAGCTGTCTCTCTTTTCCAATGGAGAAGC 3'  
*PvuII*

vPEPG: 5'TTAAGAGGCCTGTCCGATTATAAACTTGCGGC 3'  
*StuI*

Fig. 6

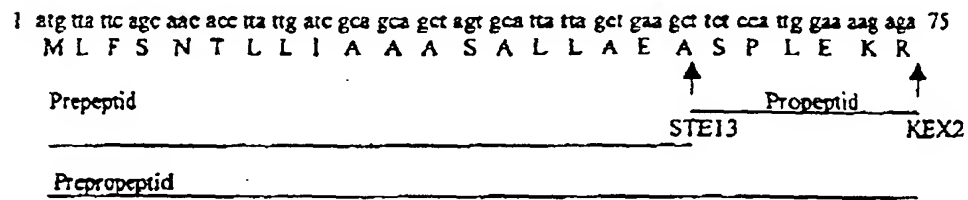
Abb.2: Signalsequenz und Signalpeptid der Endopolygalacturonase aus *Kluyveromyces marxianus*

Fig. 7



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED IN PURSUANCE OF THE PATENT CO-OPERATION TREATY (PCT)			
(19) WORLD INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION International Bureau		WIPO	
(43) International publication date: 22nd March 2001 (22.03.2001)		(10) International Publication No: WO 01/20005 A1	
		PCT	
(51)	International Patent Classification <sup>7</sup> C12N 15/56: 9/24, 15/81	(74)	Attorney: LEISSLER-GERSTL, Gabrielle; Eisenfuhr Speiser & Partner, Arnulfstrasse 25 80335 Munich (DE)
(21)	International application No: PCT/EP00/08662	(81)	Designated States (national): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
		(84)	Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI. patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22)	International filing date: 5th September 2000 (05.09.2000)		
(25)	Language of filing:	German	
(26)	Language of publication:	German	
(30)	Priority Data: 199 43 383.610th September 1999 (10.09.1999)	DE	Published: With International Search Report. Prior to expiry of the period allowed for amendment in the claims; publication is repeated if amendments are received. With details about deposited biological material lodged under Rule 13bis separately from the description
(71)	Applicants (for all designated States except US): TAD PHARMA GMBH [DE/DE]; Heinz- Lohmann-Strassw 5, 27472 Cuxhaven (DE)		For explanation of the two-letter codes and the other abbreviations reference should be made to the notes ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular issue of the PCT-Gazette.
(72)	Inventors; and		
(75)	Inventors/Applicants (only for US): BECHER, Dietmar [DE]; Darsser Weg 5, 17493 Greifswald (DE). SIEKSTELE, Rimantas [LT/LT]; Gedimino 33/17-22, 2001 Vilnius (LT). BARTKEVICIUTE, Dangoule [LT/LT]; Kovo 11, 37-31, 4058, Traku dist., Grigiskes (LT). SASNAUSKAS, Kestutis [LT/LT]; D. Gerbutavicius 1/42-87, 2050 Vilnius (LT). DÖHNER, Leopold [DE/DE]; Johann-Stelling-Strasse 1, 17489 Greifswald (DE). SALIM, Salah [DE/DE]; Wolgaster Strasse 120, 17489 Greifswald (DE).		
(54)	Title: REGULATORY SEQUENCES AND EXPRESSION CASSETTES FOR YEASTS		
(57)	Abstract: The invention concerns a DNA sequence which is active as a promoter in yeast cells, an expression and optionally secretion system containing the DNA sequence, plasmids containing the system, host cells that have been transformed with the DNA and methods for producing proteins and polypeptides.		